

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan dengan melakukan manipulasi yang bertujuan untuk mengetahui akibat manipulasi terhadap perilaku individu yang diamati (Sukardi, 2011). Penelitian ini dikatakan laboratorik karena dilakukan di dalam laboratorium dengan adanya variabel-variabel yang dikontrol. Peneliti mengadakan perlakuan terhadap sampel yang telah ditentukan yaitu berupa mencit (*Mus musculus*) Balb-C Jantan di laboratorium. Pengamatan dilakukan pada kadar lipid darah mencit yang diinduksi hiperlipidemia sebelum dan setelah diberikan tepung kulit buah naga merah.

B. Desain penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) di mana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok perlakuan akan diberikan tepung kulit buah naga merah masing-masing: 50, 100, 150 dan 200 mg/kg berat badan setiap hari pada pagi hari. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif yang diinduksi hiperlipidemia dan tidak beri perlakuan, sedangkan kontrol negatif yang tidak diinduksi hiperlipidemia dan tidak diberi perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari Federer (1977), yaitu:

$$(T - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$6(n - 1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = jumlah replikasi

T = jumlah perlakuan

Pengacakan kandang dan nomor mencit dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2006). Gambar denah pengacakan dan penempatan dalam kandang dapat dilihat pada Tabel 3.1 di bawah ini.

Tabel 3. 1. Hasil Pengocokan Nomor Mencit dan Jenis Perlakuan Dengan Tepung Kulit Buah Naga Merah.

B12	F2	A4	C15	B17	A10
D21	B16	E9	C1	E22	D19
C24	D8	A11	E18	F14	A23
F13	E7	B3	D20	C5	F6

Keterangan:

A: Kontrol positif, diinduksi hiperlipidemia dan tidak diberi tepung kulit buah naga merah.

B: Kontrol negatif, tidak diinduksi hiperlipidemia dan tidak diberi tepung kulit buah naga merah.

C: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 50 mg/kg BB/hari.

D: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 100 mg/kg BB/hari.

E: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 150 mg/kg BB/hari.

F: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 200 mg/kg BB/hari.

Berdasarkan hasil pengocokan yang dilakukan maka diperoleh peta kandang yang didapatkan seperti tertera pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2. Hasil Pengocokan Nomor Mencit dan Kandangnya.

Kandang	Nomor Mencit			
A	4	10	11	23
B	12	17	16	3
C	15	1	24	5
D	21	19	8	20
E	9	22	18	7
F	2	14	13	6

Keterangan:

A: Kontrol positif

B: Kontrol negatif,

C: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 50 mg/kg BB/hari.

D: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 100 mg/kg BB/hari.

E: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 150 mg/kg BB/hari.

F: Diberi tepung kulit buah naga merah dengan dosis 200 mg/kg BB/hari.

1, 2, 3,...: Nomor mencit.

Sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimasi selama tujuh hari. Sebelum dan sesudah adaptasi hewan ditimbang berat badan

dengan diberi makan sebanyak 5 gram/ekor/hari dan minum yang cukup secara *ad libitum* dan diambil sampel darahnya.

C. Populasi dan sampel

Hewan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur *Balb-C* dengan umur $\pm 2-3$ bulan dengan berat badan $\pm 25-30$ gram berjenis kelamin jantan sebanyak 24 ekor. Hewan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, dimana tiap-tiap kelompok terdiri dari 4 ekor. Sampel penelitian adalah mencit jantan yang sudah diinduksi hiperlipidemia. Pengamatan dilakukan terhadap kadar lipid darah sebelum diinduksi pakan tinggi lemak, setelah diinduksi pakan tinggi lemak tetapi belum diberikan perlakuan tepung buah naga merah dan setelah diberikan tepung kulit buah naga merah.

D. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan dimulai dari tahap persiapan hingga tahap pemeriksaan kadar lipid darah. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang mencit Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Pembuatan tepung kulit buah naga merah dan pengecekan lipid darah mencit dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Prosedur penelitian

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu pra-penelitian, penelitian dan pasca penelitian. Hal tersebut dirinci sebagai berikut:

1. Tahap pra-penelitian

a. Persiapan alat dan bahan

Alat dan bahan perlu dipersiapkan terlebih dahulu sebelum memulai penelitian. Hal pertama yang perlu disiapkan yaitu kandang mencit untuk menunjang kehidupan mencit. Kandang sebanyak 6 buah sesuai jumlah perlakuan disiapkan dalam keadaan bersih dengan ukuran 28 x 30 x 12 cm masing-masing dilengkapi dengan tutup dan tempat minum. Pembuatan tepung kulit buah naga merah memerlukan peralatan berupa pisau, *oven*, *blender*, dan saringan 50 mesh. Kemudian disiapkan juga bahan untuk pembuatan pakan standart dan tinggi lemak serta alat berupa

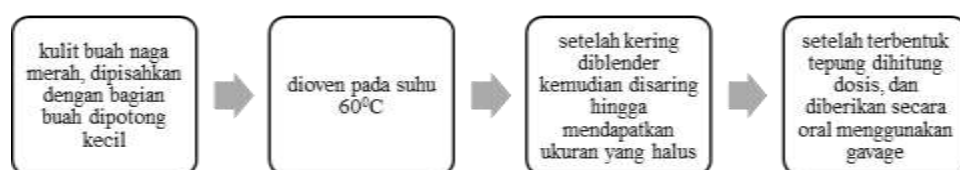
oven, penggiling daging, timbangan dan wadahnya. Serta disiapkan juga alat untuk pengambilan darah dan perhitungan kadar lipid darah mencit berupa gunting, lampu, tabung ependorf, *tips* kunig, *tips* putih, mikropipet, *centrifuge*, spektrofotometer dan kit pengujian lipid darah yang disimpan di dalam lemari pendingin.

b. Penentuan dosis

Penelitian ini dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Isvadhila (2012), pada tikus putih Hiperlipidemia dengan dosis 150 mg/200 gBB/hari, 300 mg/200 gBB/hari dan 600 mg/200 gBB/hari selama 35 hari dan penelitian lanjutan oleh Heryani (2016) dengan dosis 9 mg/200 gBB/hari, 11 mg/200 gBB/hari dan 13 mg/200 gBB/hari selama 30 hari. Dosis tepung kulit buah naga merah yang diberikan telah dimodifikasi menjadi sebanyak 50, 100, 150 dan 200 mg/kg BB. Setelah dilakukan perhitungan yang terdapat pada Lampiran 2 dosis yang digunakan adalah 1,5 mg/30gBB, 3 mg/30gBB, 4,5 mg/30gBB dan 6 mg/30gBB. Terdapat dua kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Pada kontrol positif mencit akan diinduksi pakan hiperlipidemia namun tidak akan diberi perlakuan. Pada kontrol negatif mencit tidak diinduksi hiperlipidemia dan tidak diberi perlakuan dengan tepung kulit buah naga merah. Waktu pemberian dosis diperkirakan selama 30 hari.

c. Pembuatan tepung kulit buah naga merah

Pembuatan tepung kulit buah naga merah dengan menggunakan metode *oven drying*. Prinsip kerja dari *oven drying* yaitu mengurangi kadar air dengan temperature yang tinggi tanpa menghilangkan kadar antioksidan sehingga dikeringkan pada suhu di bawah 80⁰C. Pemanasan pada suhu 80⁰C dapat merusak senyawa flavonoid (Chet, 2009).



Bagan 3.1. Langkah kerja pembuatan tepung kulit buah naga merah

Sebanyak 18 kg buah naga merah didapatkan ± 7 kg kulit buah naga merah. Kulit buah naga merah kemudian dipotong kecil-kecil lalu di oven pada suhu 60°C . Setelah kering kemudian diblender dan disaring menggunakan penyaring (50 mesh) hingga mendapatkan ukuran yang paling kecil (Bagan 3.1).

Penentuan dosis tepung kulit buah naga merah didasarkan pada dosis terapi buah naga merah yang dikonsumsi manusia, yaitu 400 gram setara dengan dosis terapi buah naga merah dalam penelitian untuk menurunkan lipid darah (Fazila *et al.*, 2006). Pemberian dosis tepung kulit buah naga merah untuk mencit dihitung dengan menggunakan perbandingan luas permukaan tubuh hewan percobaan untuk konversi dosis manusia dengan bobot 70 kg untuk mencit (*Mus musculus*) 20 gram adalah 0,0026 (Laurance, 2008). Sehingga perhitungannya $400 \text{ gram} \times 0,0026 = 1,04 \text{ gram}/20\text{gram BB}$.

d. Persiapan hewan percobaan

Disiapkan mencit jantan berumur $\pm 2-3$ bulan dengan berat badan $\pm 25-30$ gram. Hewan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, dimana tiap-tiap kelompok terdiri dari 4 ekor. Selama lima belas hari mencit dilakukan proses aklimasi terhadap lingkungan barunya agar mencit teradaptasi dengan kondisinya selama masa percobaan. Selama proses aklimasi mencit diberi pakan sebanyak 5g/ekor/hari dan diberi minum secara *ad libitum*.

e. Pengambilan sampel, determinasi, seleksi tanaman

Pengambilan sampel buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dibeli di pasar tradisional. Kemudian dilakukan determinasi untuk meyakinkan bahwa tanaman yang digunakan benar-benar *Hylocereus polyrhizus*. Kemudian seleksi buah yang segar dan bebas penyakit diambil bagian kulitnya kemudian dilakukan pengolahan menjadi tepung.

f. Pembuatan pakan standar dan tinggi lemak

Komposisi pakan yang digunakan untuk induksi hiperlipidemia adalah tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, kuning telur, CaCO_3 ,

premix, telur, garam, dan minyak kelapa. Sedangkan untuk pakan standart tidak ditambahkan kuning telur dan pengurangan jumlah minyak kelapa. Bahan-bahan tersebut dicampurkan dan dibuat menjadi pakan, untuk komposisinya dapat dilihat pada Tabel 3.3 di bawah ini.

Tabel 3. 3. Komposisi Pakan Tinggi Lemak

No.	Bahan	Jumlah penambahan (%)
1.	Tepung jagung	60
2.	Tepung ikan	8
3.	Bungkil kedelai	20
4.	Telur	3
5.	Minyak kelapa	6
6.	<i>Premix</i>	1
7.	Garam	1
8.	CaCO ₃	1

(Sumber: Hernawati *et al.*, 2013)

2. Tahap penelitian

a. Pemberian pakan tinggi lemak untuk induksi hiperlipidemia

Pakan berlemak tinggi diberikan untuk membuat mencit mengalami hiperlipidemia. Peningkatan kadar kolesterol dapat dipicu oleh tambahan bahan seperti 1,5% kuning telur ayam, 10% lemak dan 1% minyak kelapa (Rismawati *et al.*, 2012). Mencit diinduksi dengan pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 5g/ekor/hari kecuali untuk kelompok kontrol negatif diberi pakan standar.

b. Pemberian tepung kulit buah naga merah

Pemberian tepung kulit buah naga merah dengan dosis 50, 100, 150 dan 200 mg/kg berat badan dilakukan selama 30 hari setelah mencit mengalami hiperlipidemia. Tepung buah naga merah diberikan secara oral menggunakan jarum *gavage*. Selama perlakuan mencit dibagi menjadi enam kelompok yaitu:

- 1) Kelompok A: kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan yaitu tidak diinduksi hiperlipid dengan diberi pakan standart dan tidak diberi tepung kulit buah naga merah.

- 2) Kelompok B: kontrol positif, yaitu mencit yang diinduksi hiperlipid dengan diberi pakan tinggi lemak tetapi tidak diberi tepung kulit buah naga merah.
 - 3) Kelompok C: perlakuan dengan dosis 1 yang diberi tepung kulit buah naga merah sebanyak 3 mg/30gBB/hari.
 - 4) Kelompok D: perlakuan dengan dosis 2 yang diberi tepung kulit buah naga merah sebanyak 6 mg/30gBB/hari.
 - 5) Kelompok E: perlakuan dengan dosis 3 yang diberi tepung kulit buah naga merah sebanyak 9 mg/30gBB/hari.
 - 6) Kelompok F: perlakuan dengan dosis 4 yang diberi tepung kulit buah naga merah sebanyak 12 mg/30gBB/hari.
- c. Pengambilan sampel darah dan pengukuran kadar lipid darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada awal setelah aklimasi, setelah 20 hari diberi pakan tinggi lemak dan setelah perlakuan dengan pemberian tepung kulit buah naga merah terhadap mencit. Lokasi pengambilan sampel darah pada bagian vena lateral ekor. Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, terlebih dahulu ekor mencit dihangatkan di bawah sinar lampu supaya pembuluh darah ekor membesar dan darah mengalir cepat. Pengambilan darah dengan cara melukai bagian ujung ekor kemudian diurut-urut bagian ekornya secara halus dan menetes ke dalam tabung ependorf.

Sampel darah yang diambil sekitar 0.5-1.0 ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000 rpm selama 10 menit untuk uji kolesterol, trigliserida, HDL darah. Serum (supernatan) diambil dengan mikropipet berkala. Selanjutnya, serum diukur dengan metode yang dilakukan untuk menguji kadar darah tersebut menggunakan *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP) dan *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP) secara spektrofotometri (Trinder, 1969). Dasar metode CHOD-PAP dan GPO-PAP adalah oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Pengukuran LDL dengan metode Friedewald yang dinyatakan

dalam satuan mg/dL (Friedewald *et al.*, 1972). Pengukuran kadar kolesterol total, trigliserida dan HDL secara spektrofotometri dengan mencampurkan serum dan reagen produksi BIOLABO. Berikut ini adalah tahapan untuk pengukuran kadar lipid darah hewan uji:

1) Uji kolesterol total

Pengujian kolesterol total yaitu dengan cara memasukkan reagen kolesterol sebanyak 1000µl ditambah dengan 10 µl serum darah ke dalam tabung mikro. Kemudian tunggu selama 10 menit lalu dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Setelah itu diperoleh data dari spektrofotometer kemudian data dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{absorbansi standar}} \times 200 = \text{kolesterol total}$$

2) Uji trigliserida

Pengujian trigliserida yaitu dengan cara memasukkan reagen trigliserida sebanyak 1000µl ditambah dengan 10 µl serum darah ke dalam tabung mikro. Kemudian tunggu selama 10 menit lalu dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Setelah itu diperoleh data dari spektrofotometer kemudian data dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{absorbansi standar}} \times 200 = \text{trigliserida}$$

3) Uji HDL

Pengujian HDL yaitu dengan cara memasukkan reagen HDL sebanyak 50µl ditambah dengan 0.5 µl serum darah ke dalam tabung mikro lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit hasil yang didapatkan berupa pellet dan supernatant. Supernatant sebanyak 25µl dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru kemudian ditambahkan dengan 1000 µl reagen kolesterol. Kemudian tunggu selama 10 menit lalu dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Setelah itu

diperoleh data dari spektrofotometer kemudian data dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{absorbansi standar}} \times 100 \times 1.1 = \text{HDL}$$

4) Uji LDL

Setelah pengujian dilakukan semua maka nilai absorbansi LDL dihitung dengan rumus:

$$\text{kolesterol total} - \left(\text{HDL} + \frac{1}{5} \text{trigliserida} \right) = \text{LDL}$$

F. Tahap pasca penelitian (Analisis statistik)

Data dianalisis dengan menggunakan program SPSS 22 for Windows. Tahap pengujiannya pertama dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena $n < 50$ setelah itu dilakukan uji homogenitas. Jika data yang diperoleh homogen dan normal maka dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA* (*Analysis of Variance*). Data yang memiliki perbedaan signifikan diuji lebih lanjut dengan uji *Duncan* dengan derajat kepercayaan 95% ($p < 0,05$). Uji T berpasangan atau *paired samples T-test* dilakukan untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan. Jika data yang diperoleh tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis*. Data yang pebedaannya tidak signifikan tidak diuji lanjut sedangkan data yang perbedaan signifikan diuji *Mann-Whitney*. Selanjutnya dilakukan uji *Wilcoxon* untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan.

G. Alur penelitian

Berdasarkan prosedur yang sudah dijelaskan sebelumnya dipoint E, secara singkat alur langkah kerja penelitian dapat dijelaskan sesuai dengan Bagan 3. 2 di bawah ini.

